TOYOBO　　＜研究用試薬＞

取 扱 説 明 書

□ラット髭毛乳頭細胞 Total Kit　(Code.TMTRPCK-001)

□ラット髭毛乳頭細胞 (RVPC)　(Code.TMTRPC-001)

このたびは、ラット髭毛乳頭細胞 Total Kit ・ ラット髭毛乳頭細胞をお買い上げ頂き有り難うございます。
皆様の研究に有効にお使い頂くために、本取扱説明書を、ご使用前に必ずお読み下さい。

＜ご注意＞

本製品の使用は研究用に限定されています。ヒトまたは動物への適用及び臨床診断用への使用はできません。

1. 製品内容

(○印は各キットに含まれるものです。)

内容		Code	TRPCK-001	TRPC-001	TPGM-250
		キット種類	ラット髭毛乳頭細胞 Total Kit	ラット髭毛乳頭細胞	毛乳頭細胞増殖培地
ラット髭毛乳頭細胞	RVPC	凍結バイアル2本 ($5x10^5$cell以上)	○	○	
毛乳頭細胞増殖培地(基礎)	PCGM (BM)	250ml	○		○
増殖培地添加剤 牛胎児血清	FCS	5ml	○		○
増殖培地添加剤 インスリン・トランスフェリン・トリヨードサイロニン混液	ITT	1.5ml	○		○
増殖培地添加剤 牛下垂体抽出液	BPE	2.5ml	○		○
増殖培地添加剤 サイプロテロン溶液	Cyp	1.5ml	○		○
トリプシン/EDTA 溶液	Trypsin/EDTA	30ml	○		
トリプシン中和液	Trypsin Neutralizing Solution	30ml	○		
PBS		100ml	○		
コラーゲンコート溶液	Collagen Coating Solution	50ml	○		
コラーゲンコート T-75 フラスコ		1 本	○		

サブカルチャー試薬セットB (トリプシン/EDTA溶液、トリプシン中和液、PBSを含む、Code.TMTSC-K) 及びコラーゲンコート溶液 (Code.TMTCC-050) も別途販売致しております。ご要望の方は弊社までお申し付け下さい。

2. 製品の受入と保存

(1) 製品の受入

製品が入荷したら直ちに開封し、各パーツの本数及び輸送による破損が無いか、培地等の液漏れはないか、ご確認下さい。異常がある場合には直ちに東洋紡(株)ライフサイエンス事業部(大阪:06-6348-3786、東京:03-3660-4819)までご連絡下さい。

(2) 培地・継代用試薬の保存

培地、コラーゲンコート溶液、及びコラーゲンコートT-75フラスコは冷蔵保存(4℃)して下さい。培地添加剤及び継代用試薬については、凍結保存(-20℃)して下さい。このとき、凍結融解の回数は極力少なくするよう、分注保存されることをお薦めします。

(3) 細胞の受入

細胞は凍結状態(-80℃)で、2.5x10^{5}cell以上/ﾊﾞｲｱﾙを2本出荷しております。到着後すぐご使用になられない場合は、直ちに液体窒素中に保存してください。

3．ラット髭毛乳頭細胞 (RVPC)　凍結ﾊﾞｲｱﾙx2本；　Code．TMTRPC-001

ﾗｯﾄ髭毛乳頭細胞は Wister 種ﾗｯﾄ頬髭部毛乳頭から分離培養した毛乳頭細胞です。近年の研究から、毛乳頭は毛の形成、成長に深く関与していることが知られており、本細胞は医薬品・育毛剤の効果試験、安全性試験、薬理試験、育毛・発毛の研究等にご利用できます。本細胞の品質管理は増殖性試験・特性試験 (ｱﾙｶﾘﾌｫｽﾌｧﾀｰｾﾞ活性陽性・第Ⅷ因子陰性) を行い、基準に達したものを出荷致しております。本製品は3～4継代目の細胞を凍結状態で出荷致しております。本細胞は到着後、2～3継代の培養が可能です。実験にはなるべく若い継代数のものをお使い下さい。本製品はマイコプラズマは陰性であり、また由来するラットはＳＰＦ管理したものを使用しておりますが、その他ウイルス検査を行っておりません。細胞の取扱いには十分にご注意下さい。

(1) 細胞の溶解

① 溶解した細胞を懸濁させるための ＰＣＧＭ を１０ml、１５ml遠心チューブに分注し、氷冷しておく。

② バイアル1本を取り出し、３７℃恒温槽で急速に溶解する。

(注) このとき、液体窒素が噴出することがあるので、必ず保護具を着用して下さい。
また、コンタミの危険を避ける為、バイアルの蓋を水槽に漬けないようにして下さい。

③ バイアル内に氷塊が少し残る程度になれば、バイアルを氷中に戻す。

(注) 細胞生存率が低下する原因になりますので、必要以上の加温は避けて下さい。

④ バイアル中の細胞浮遊液を全量 (約０．５ml) 、①の浮遊用培地１０mlに穏やかに添加する。

(注) 凍結液には DMSO が入っています。急速に希釈・懸濁すると、細胞生存率が低下する原因になります。
穏やかに操作して下さい。

⑤ 浮遊細胞を冷却低速遠心機で4℃、1000rpm、5分間　遠心する。

⑥ 沈殿した細胞を吸わないように注意しながら上清を吸引し、約1mlの ＰＣＧＭ に再懸濁させる。

⑦ 全量を添付のコラーゲン T-75 フラスコに植え込む。

(注) 細胞の播種密度は約 3,000cell/cm2 が適当です。5 日前後でコンフレントに達します、
播種密度は実験条件に応じて調整して下さい。

(2) 培地交換

培地交換は1日おきに行います。

① 調製した ＰＣＧＭ を必要量だけ３７℃あるいは室温に温める。

② クリーンベンチ内でフラスコから古い培地を吸引除去し、①の培地を入れる。

※ *培地量は、T-25 フラスコ／φ６０mmシャーレでは5ml、T-75 フラスコ／φ１００mmシャーレでは１５mlが適量です。*

(3) 細胞の継代培養

A継代用試薬の準備

弊社サブカルチャー試薬セット B (Code.TSC-K) をお使いになる場合は以下のような手順によります。

① 継代用試薬 (トリプシン/EDTA 溶液、トリプシン中和液、PBS) を37℃あるいは室温で解凍する。
② 各試薬が完全に溶けていることを確認し、数回穏やかに撹拌し、均質な溶液とする。
③ 解凍した継代用試薬は 4℃に保存する。

B培養のためのフラスココーティング

RVPCを培養する際は、下記要領に従い、フラスコを Total Kit に添付のコラーゲンコート溶液にてコーティング処理を行って下さい。コラーゲンコートにより細胞のフラスコへの接着が向上します。なお、Total Kit に添付の T-75 フラスコはあらかじめコラーゲンコーティング処理をおこなっていますので、そのままお使い下さい。また、市販のコラーゲンコート培養フラスコをお使い頂く場合は以下の操作は不要です。

① コラーゲンコート溶液を穏やかに撹拌し、均質な溶液とする。
② クリーンベンチ内でフラスコにコラーゲンコート溶液を約 1ml/10cm^{2}となるように加え、フラスコ培養面全体に液が広がるようにフラスコを静かに揺らす。
③ 室温で 30 分～2 時間静置する。
④ クリーンベンチ内でコラーゲンコート溶液を吸引除去する。
⑤ PBSを約 1ml/10cm^{2}となるように入れ、フラスコ培養面を洗い、吸引除去する。この洗浄操作をさらに2回行う。
⑥ 最後に PBS を全て取り除き、コーティング作業は終了する。コーティングしたフラスコはキャップを堅く閉め、4℃に保存する。2週間以内に使用する。

C.細胞の回収

細胞がサブコンフレントな状態まで培養したら、下記要領 (T-75 フラスコの例) に従い細胞を回収します。

① クリーンベンチ内にて、細胞を培養しているフラスコから培地を吸引除去する。
② Total Kit に添付の PBS 5mlを加え、細胞接着面を洗浄する。洗浄後、PBS は吸引除去する。この操作をさらにもう一度行い、細胞を洗浄する。
③ T-75 フラスコにトリプシン/EDTA 溶液0．5～1mlを入れる。直ちに、フラスコを揺らし、トリプシン/EDTA 溶液をフラスコ培養面全体にいきわたらせる。
④ フラスコのキャップを閉め、細胞がトリプシン消化される過程を顕微鏡下で観察する。通常は1～3分程度で細胞が丸くなってくる。過消化に注意する。
⑤ ほとんどの細胞が丸くなり、浮き始めてきたら、フラスコの側面、底面を手のひらで叩き、細胞を十分はがす。
⑥ 細胞が十分はがれたら、等量のトリプシン中和液 (0．5～1ml) を加える。直ちに、フラスコを揺らし、トリプシン中和液をフラスコ培養面全面にいきわたらせ、トリプシン反応を停止させる。
⑦ PBS を7．5ml加え、フラスコ培養面を穏やかにリンスするように細胞をはがす。
⑧ 細胞浮遊液を15ml遠心チューブに回収する。
⑨ 冷却低速遠心機にて 1000rpm、5分間遠心し、細胞を沈殿させる。
⑩ 細胞を吸わないように注意しながら、上清を吸引除去する。
⑪ PCGM 1mlを加え、穏やかにピペッティングし、細胞を再浮遊させる。
⑫ 血球計算盤あるいはセルカウンターで細胞数を計測する。このとき、トリパンブルーによる細胞生存率の測定を行うと、より正確な生細胞数を把握することができる。

⑬ 細胞浮遊液を予め用意したフラスコに細胞浮遊液、及びＰＣＧＭを入れる。インキュベーターに入れ、培養を行う。細胞継代後、2時間（細胞の接着が安定するまで）は静置させる。培養は 37℃、5% CO_2、加湿で行う。

⑭ 1日後、培地の交換を行う。以後、1日おきに培地の交換を行う。

※ *細胞の継代は、2,0000cell/cm^2の密度で播種するのが目安です。従って、T-25 フラスコ／φ60mmシャーレには 3x10^6cell、T-75 フラスコ／φ100mmシャーレには 1.5x10^5 cellが最適です。また、培地量はT-25 フラスコ／φ60mmシャーレでは 5ml、T-75 フラスコ／φ100mmシャーレでは 15mlが適量です。*

TOYOBO ＜研究用試薬＞

4．毛乳頭細胞増殖培地（PCGM） 250ml：Code.TMTPGM-250

本増殖培地は毛乳頭細胞の培養に最適になるように調製した低血清培地です。血清量を1％に抑えているため、研究評価において問題となる血清の影響を最小限にすることができます。調製は添付の培地添加剤（4種類）を加えるだけで OK です。

（1） 内容

① 毛乳頭細胞増殖培地（基礎）：PCGM（BM）、250ml

細胞培養に必要な各種アミノ酸、ビタミン、及び抗生物質（ゲンタマイシン）を含みます。冷蔵保存でラベルに表示の使用期間内にご使用下さい。冷凍保存はできません。

② 牛胎児血清：FCS、5ml

細胞増殖・接着を促進します。

③ ｲﾝｽﾘﾝ・ﾄﾗﾝｽﾌｪﾘﾝ・ﾄﾘﾖｰﾄﾞｻｲﾛﾆﾝ混液：ITT、1.5ml

細胞増殖を促進します。

④ 牛下垂体抽出液：BPE、2.5ml

細胞増殖を促進します。

⑤ ｻｲﾌﾟﾛﾃﾛﾝｱｾﾃｰﾄ：Cyp、1.5ml

男性ホルモンの一種。細胞増殖を促進します。

ホルモン作用の実験等をされる場合は、添加せずに培養して下さい。

（2）調整方法

① 培地添加剤を 37℃の恒温槽あるいは室温で解凍する。

② 基礎培地及び培地添加剤の容器を 70%エタノールで拭き、クリーンベンチ内に入れる。以下の操作は無菌的に行う。

③ 下記の容量の培地添加剤を基礎培地に添加する（全量ではありません。ご注意下さい。）

内容	希釈率	標準混合容量
基礎培地	ーーー	250ml
FCS	100 倍希釈	2.5ml
ITT	200 倍希釈	1.25ml
BPE	100 倍希釈	2.5ml
Cyp	200 倍希釈	1.25ml

④ 穏やかに混合する。

※ *培地添加剤を添加後は、ラベル表示の有効期限に関わらず、冷蔵保存にて2週間以内にご使用下さい。*
また、継代等に御用される場合は、必要量を 37℃に保温して使うようにし、全量の保温は避けて下さい。

ご注意

- **本製品の使用は研究用に限定されています。ヒトまたは動物への適用及び臨床診断用への使用はできません。**
- **本製品はウイルス検査を行い、混入否定を確認しておりますが、ヒト由来ですので細胞の取扱いには十分にご注意下さい。**
- **本製品によって生じたいかなる事故あるいは損害についても弊社では責任を負いかねます。ご了承の上、ご使用下さい。**

本製品に関して後不明な点、ご質問等ございましたら、Toyoboテクニカルラインまでご連絡下さい。

＜連絡先＞ Tel：06-6348-3888、 Fax：06-6348-3833、 E-mail：techosk@bio.toyobo.co.jp

---

◆ 製造・販売元：

東洋紡績株式会社

(大阪) ライフサイエンス事業部 〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
Tel:06-6348-3786、 Fax:06-6348-3883

(東京) ライフサイエンス事業部 〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町17番9号
Tel:03-3660-4819、 Fax:03-3660-4951